

昆虫中肠液性质对苏云金芽孢杆菌 伴孢晶体毒力的影响

邵宗泽^{1,2}, 喻子牛³

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物工程重点实验室, 厦门 361005; 2. 山东农业大学生命科学学院, 泰安 271018;

3. 华中农业大学微生物科学技术系, 农业部农业微生物重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 综述了昆虫中肠液性质对苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* 伴孢晶体毒力的影响。中肠液的酸碱度和蛋白酶是影响伴孢晶体溶解与原毒素活化的两大因素。中肠液的酸碱度不仅影响到伴孢晶体的溶解速度, 还影响到各种蛋白酶的活性表现; 而蛋白酶则直接参与了原毒素的活化, 其组成与活性影响着原毒素的活化速度和杀虫专一性。因中肠液蛋白水解能力过高而导致原毒素的过度降解是某些昆虫对苏云金芽孢杆菌低度敏感的主要原因, 而中肠液对原毒素活化能力的降低则与昆虫抗性的形成有关。此外, 中肠液的沉淀作用及其它生理生化特性也影响着原毒素毒力的正常发挥。

关键词: 苏云金芽孢杆菌; 中肠液; 伴孢晶体; 毒力; 蛋白酶

中图分类号: Q965.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296 (2002) 03-0384-07

The effects of larval midgut fluid on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal

SHAO Zong-Ze^{1, 2}, YU Zi-Niu³ (1. The Third Institute of Oceanography, Xiamen 361005, China; 2. Life Science College, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 3. Dept. Microbial Science & Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: The effects of larval midgut fluid on the toxicity of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal were reviewed in this paper. The characteristics of larval midgut juice, including pH value, the composition and activity of proteases, affect not only the crystal solubility and efficiency of protoxin activation, but also its insecticidal specificity. On the other hand, excessive degradation of protoxins in midgut juices was responsible for the low susceptibility of some insects. On the contrary, the retardation of protoxin activation in midgut juice contributes to the resistance of some insects against Bt. Moreover, the precipitation effect of gut juice on protoxins was another factor to lower Bt toxicity.

Key words: *Bacillus thuringiensis*; midgut fluid; protease; parasporal crystal; insecticidal activity

苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, Bt) 进入生长稳定期后能产生多种杀虫晶体蛋白 (insecticidal crystal proteins), 并以伴孢晶体 (parasporal crystal) 的形式在菌体内积累。伴孢晶体是苏云金芽孢杆菌产生的主要杀虫成分, 当被昆虫幼虫食入后, 在幼虫中肠液中溶解并释放出杀虫蛋白。大分子量杀虫蛋白, 在它们与中肠上皮膜受体结合以前首先需经幼虫中肠液蛋白酶活化, 从原毒素 (protoxin) 分子的 N-、C-末端分别切除部分氨基酸残基, 形成能抵抗蛋白酶进一步降解的、具有杀虫活性的毒性肽 (Hofte and Whiteley, 1989; Gill and

Cowles, 1992)。

完整的毒性肽一般都含有 3 个结构域: 位于毒性肽 N-端的结构域 I 为一束双亲的 α -螺旋束, 参与了膜的穿孔; 结构域 II 为 3 组 β -片层, 参与了毒素与受体的结合; 位于 C-末端的结构域 III 为三明治结构, 可能有利于阻止蛋白酶对毒素分子的进一步降解 (Li et al., 1991; Grochowski et al., 1995)。一个结构完整的毒性肽的活化形成是杀虫晶体蛋白整个杀虫过程的第一步、也是非常关键的一步。但是, 越来越多的研究证明, 目标害虫的中肠液的特性不仅影响到杀虫晶体蛋白的杀虫活性高低, 而且

与昆虫对 Bt 的抗性产生有关。本文就昆虫中肠液的生理生化性质对杀虫晶体蛋白杀虫活性的影响作一综述。

1 昆虫中肠液的酸碱度和蛋白酶组成

不同目昆虫幼虫的中肠液性质差异很大。如鳞翅目幼虫中肠液呈碱性 (pH 8.0 ~ 10.5)，其主要蛋白酶是以胰蛋白酶 (trypsin) 为主的丝氨酸蛋白酶 (serine protease) (Christeller *et al.*, 1992; Xu and Qin, 1994; Lee and Anstee, 1995; Johnston *et al.*, 1991, 1995; Ortego *et al.*, 1996)。许多鳞翅目幼虫中肠液中皆含有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)、弹性蛋白酶 (elastase)、羧肽酶 A (carboxypeptidase A)、羧肽酶 B (carboxypeptidase B) 和亮氨酸氨肽酶 (leucine aminopeptidase) (Christeller *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1994)。Christeller 等 (1992) 报道, 在多食性和食果性幼虫中肠液中弹性蛋白酶的活性最高。然而, Johnston 等 (1995) 发现烟芽夜蛾 *Heliothis virescens* 中肠液中有较高的胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶活性, 而弹性蛋白酶的活性较低。关于各种蛋白酶在幼虫肠道中的分布, Ortego 等 (1996) 发现在茎蛀夜蛾 *Sesamia nonagrioides* 中肠内胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶、羧肽酶 B 主要分布在中肠前段围食膜与肠壁的间隙 (enterotrophic space) 内; 而氨肽酶和羧肽酶 A 则主要分布在围食膜外部空间内 (ectoperitrophic space)。

大多数鞘翅目幼虫中肠液为中性或略偏酸性 (pH 6.5 ~ 7.0)，其主要蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶。例如两星瓢虫 *Adalia bipunctata* L. 幼虫和成虫中肠液的 pH 分别为 6.0 和 5.5, 半胱氨酸蛋白酶专一性抑制剂 E-64 可有效抑制中肠液的蛋白酶活性, 说明该幼虫中肠液的主要蛋白酶为半胱氨酸蛋白酶 (Walker *et al.*, 1998)。也有少数鞘翅目幼虫中肠液略偏碱性 (7.0 ~ 7.5)，其主要蛋白酶为胰蛋白酶 (如褐新西兰肋翅鳃角 *Costelytra zealandica* 幼虫) (Christeller and Shaw, 1989)。而马铃薯甲虫 *Leptinotarsa decemlineata* Say 中肠液虽为酸性 (pH 5.5 ~ 6.5)，但含有胰凝乳蛋白酶、羧肽酶 A、亮氨酸氨肽酶等类似酶, 此外还有组织蛋白酶 (cathepsin) B、D、H 等; 其中, 胰凝乳蛋白酶可能与杀虫晶体蛋白的活化有关 (Novillo *et al.*, 1997)。

双翅目幼虫中肠液呈弱碱性, 也是以胰蛋白酶

为主。在冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 中肠液中有三种丝氨酸蛋白酶, 而且它们的基因已经被克隆 (Siden-Kiamos *et al.*, 1989)。

2 中肠液酸碱度对杀虫晶体蛋白毒力的影响

中肠液酸碱度不仅影响到伴孢晶体在消化道的溶解速度, 而且还影响到原毒素的活化效率、乃至杀虫专一性。沙槎云和白成 (1994) 报道了在 pH 6.4、7.4、8.4、9.4 的缓冲液中粘虫 *Mythimna separata* 和黄粉虫 *Tenebrio molitor* 中肠液对 5 个 Bt 菌株伴孢晶体的降解过程和毒力变化。随着 pH 值的升高, 两种幼虫中肠液对苏云金亚种 (subsp. *thuringiensis*) 的 457 菌株、多窝亚种 (subsp. *tolworthi*) 的 10-4-13 菌株及库斯塔克亚种 (subsp. *kurstaki*) 的 HD-1 菌株的伴孢晶体的溶解或降解能力都有较大提高, 而对肯尼亚亚种 (subsp. *keneya*) 和山东亚种 (subsp. *shandongiensis*) 的影响不明显, 溶解能力较弱。在 pH 9.4 时, 前 3 种菌株的伴孢晶体经黄粉虫中肠液活化后其上清液对黄粉虫的毒性丧失, 而对粘虫毒性较高。这说明改变中肠液 pH 导致了 Bt 杀虫特异性的改变。我们曾比较过菜粉蝶 *Pieris rapae* 和家蚕 *Bombyx mori* 幼虫对库斯塔克亚种 4 个菌株的敏感性差异。结果表明, 菜粉蝶幼虫对 HD-1 等菌株的敏感性较低, 其主要原因是该幼虫中肠液不能快速地将伴孢晶体活化成毒性肽。但当提高中肠液 pH 值后 (从 pH 9.7 到 pH 10.5), 活化能力和敏感性都明显提高 (与家蚕幼虫相近) (邵宗泽和崔云龙, 1995)。

Qi 和 Bechtel (1994) 研究了不同 pH 值对 Cry1Aa、Cry1Ac 和 Cry3A 三种杀虫晶体蛋白毒性肽构象变化的诱导。无论是对鞘翅目有毒的 Cry3A, 还是对鳞翅目有毒的 Cry1Aa、Cry1Ac, 发生构象变化时的 pH 即为该毒素发挥最大毒力时的 pH。也就是说, 各种毒素蛋白只有在目标昆虫中肠液的 pH 下才能保持一种“优势”的构象。实际上, 各类杀虫晶体蛋白的杀虫专一性与其溶解特性是相对应的, 鳞翅目和双翅目幼虫中肠液一般呈碱性, 这种条件恰好适合 Cry1、Cry4 等大分子毒素伴孢晶体在目标昆虫中肠液中溶解; 而鞘翅目幼虫中肠液为弱酸性, 这种条件恰好适合于杀鞘翅目幼虫的 Cry3 晶体的溶解和维持毒性肽的正确构象。

3 肠道蛋白酶对杀虫晶体蛋白的活化作用

在体外, 杀虫晶体蛋白能被多种碱性蛋白酶(如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、弹性蛋白酶)以及巯基蛋白酶(如木瓜蛋白酶)活化成 55~70 kD 的毒性肽(Choma and Kaplan, 1990)。在鳞翅目幼虫中肠液中, 胰蛋白酶是主要的蛋白酶, 在原毒素的活化过程中起着重要作用, 它专门水解由碱性氨基酸(Lys、His、Arg)的羧基组成的肽键(Ogiwara *et al.*, 1992; Milne and Kaplan, 1993)。例如, Cry1Ac 原毒素(133 kD)经家蚕、小菜蛾 *Plutella xylostella* 和茶小卷叶蛾 *Adoxophyes sp.* 等鳞翅目幼虫中肠液活化后, 形成的毒性肽的 N-末端氨基酸顺序是 N-IETHYTPIDISLSLT, 其切点均为由第 28 个精氨酸的羧基和相邻的异亮氨酸(I)组成的肽链(Ogiwara *et al.*, 1992)。双翅目幼虫家蝇 *Musca domestica* 肠道蛋白酶在 Cry1Ac 分子的 N-末端上的切点同上述鳞翅目幼虫, 说明在双翅目幼虫的中肠液中同样是胰蛋白酶发挥了作用(Ogiwara *et al.*, 1992)。已知, 类似大分子毒素的碳端都含有大量的碱性氨基酸, 由它们形成的肽键都是胰蛋白酶的潜在切点。在毒性肽分子中虽然也含有个别碱性氨基酸, 但由于肽链折叠造成的空间位阻使蛋白酶不能接近其潜在酶切点。

活化原毒素所需的蛋白酶因原毒素和昆虫的种类而异。在五带淡色库蚊 *Culex quinquefasciatus* 幼虫中肠液中发现有胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和嗜热菌蛋白酶(themolysin), 其活性随 pH 值升高而增加。其中胰凝乳蛋白酶和嗜热菌蛋白酶参与了溶解状态的 Cry11Aa(72 kD)进一步的活化过程, 而对于伴孢晶体形式的 Cry11Aa 的溶解与活化还必须有胰蛋白酶的参与; 溶解状态的 Cry11Aa 首先在 Thr347 和 Phe348 之间和 Phe348 与 Tyr349 之间, 形成 40 kD 的 N-末端片段和 32.5 kD 的 C-末端片段, 32.5 kD 片段能抵抗蛋白酶的进一步降解, 而 40 kD 的 N-末端片段很不稳定, 可被进一步降解成 36 kD 的片段。与溶解状态不同, Cry11Aa 的伴孢晶体在中性 pH 值下难以降解, 在 pH 高于 9.5, 37℃ 过夜处理后才能形成 30、28.5 和 28 kD 的 3 个片段, 上述 3 种蛋白酶分别参与了这 3 个片段的形成(Dai and Gill, 1993)。

Cry4 类的杀虫晶体蛋白在蚊幼虫中肠液中往往

被活化成两个相互作用的小分子毒性肽。例如, 在埃及伊蚊 *Aedes aegypti*、冈比亚按蚊 *Anopheles gambiae* 或五带淡色库蚊中肠液中, 来自以色列亚种的杀蚊 130 kD 蛋白 Cry4A 可被活化成 48 kD 的毒性片段, 而 130 kD 的 Cry4B 则被活化成 46~48 kD 和 16~18 kD 的两个片段(Angsuthanasombat *et al.*, 1992)。Sakai 等(1998)进一步报道, 在尖音库蚊 *Culex pipiens* 中肠液中, Cry4A 被活化成相互连在一起的 20 kD 和 45 kD 2 片段, 而 Cry4B 则被活化成 18 kD 和 46 kD 的 2 片段。Cry4A 形成的 2 片段可能一起作用方具活性, Cry4B 形成的 2 片段也可能是相互连在一起的, 但其杀虫活性经体外处理后很快下降并几乎丧失。但是, 参与这些过程的蛋白酶未见报道。

以前认为 Cry2 和 Cry3 等中分子量毒素(65~75 kD)为天然毒性肽, 溶解后不需活化即具毒性(Gill and Cowles, 1992)。现在看来并不然, 例如拟步行甲亚种(subsp. *tenebrionis*)产生的 Cry3A(73 kD)在菌体内合成后即被胞内蛋白酶迅速活化成 67 kD 的毒性肽, 由它形成的伴孢晶体可溶于碱性和酸性缓冲液中, 但是溶解后的毒素在回到中性环境时会发生沉淀。然而, 目标甲虫的中肠 pH 即为中性到微酸性, 这是 Cry3A 体外不溶解的 pH 环境。为解开此谜, Carroll 等(1998)对经各种蛋白酶处理后的 Cry3A 毒素进行了研究。发现该毒素在大多数情况下被进一步切成多个多肽片段, 它们在非变性条件下仍保持相互联系。有意思的是, 胰凝乳蛋白酶的 Cry3A 处理产物在中性 pH 条件下变得可溶, 并全部保留了对敏感甲虫的毒性, 且与马铃薯叶甲中肠上皮细胞膜呈专一性结合。在体内, 参与 Cry3A 活化的蛋白酶也是胰凝乳蛋白酶(Martinez-Ramirez and Real, 1996)。

4 肠道蛋白酶对杀虫晶体蛋白杀虫专一性的影响

幼虫肠道蛋白酶对原毒素水解处理上的差异对杀虫晶体蛋白的杀虫专一性有影响(Haider *et al.*, 1986; 李荣森和盛竹蓿, 1993)。Haider 等(1986)发现, 考莫立亚种(subsp. *colmeri*)的 130 kD 的 Cry1C 原毒素经埃及伊蚊中肠液活化后, 所得产物仅对蚊虫细胞系有毒, 而对大多数鳞翅目细胞系无毒; 相反, 经大菜粉蝶 *Pieris brassicae* 幼虫中肠液或胰蛋白酶活化后, 所得产物仅对鳞翅目细胞系有毒。进一步研究揭示, 130 kD 原毒素经大菜粉蝶

中肠液或胰蛋白酶活化后形成 55 kD 的毒性肽；而经埃及伊蚊中肠液活化形成 52 kD 的毒性肽，前者可进一步被埃及伊蚊中肠液活化形成后者。

即使都是鳞翅目幼虫也有类似现象。李荣森和盛竹莓(1993)报道, 130 kD 原毒素经斜纹夜蛾肠道蛋白酶作用后形成了较大分子量的毒性肽(72 kD 左右); 经家蚕肠道蛋白酶作用则形成了较小分子量的毒性肽(63 kD 左右)。前者对这 2 种昆虫都有毒性, 并可进一步活化成后者, 而后者却丧失了对斜纹夜蛾的毒性。这些结果表明, 肠道蛋白酶组成影响到毒性肽的大小及其在原毒素上的酶切位置, 从而影响到毒素的杀虫专一性。

5 昆虫中肠液对杀虫晶体蛋白的过度降解与沉淀作用

同一目不同科、甚至同一科不同种的昆虫对同种杀虫晶体蛋白的敏感性表现不同(Hofte and Whiteley, 1989; 邵宗泽和崔云龙, 1995; Van Frankenhuyzen *et al.*, 1993)。例如鳞翅目夜蛾科的幼虫对 Cry1Ac 较为敏感而蚕蛾科的家蚕对它却极不敏感, 而同是夜蛾科的 2 种幼虫棉铃虫 *Helicoverpa armigera* 和甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua*, 却分别对 Cry1Ac 或 Cry1C 有较高的敏感性。

影响杀虫晶体蛋白杀虫活性的因素是多方面的, 除了与毒素和受体的特性有关外, 中肠蛋白酶的种类及活性高低也对杀虫晶体蛋白的杀虫活性有重要影响。例如, Cry1A 经斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 固定化的肠道蛋白酶活化形成的毒性肽的浓度仅是经其它幼虫所得浓度的 1/20(Ogiwara *et al.*, 1992)。一般认为, 夜蛾科的老龄幼虫对杀虫晶体蛋白的敏感性比一、二龄幼虫要低(Sneh *et al.*, 1981; Bai *et al.*, 1993)。这是否与老龄幼虫中肠液对原毒素的活化有关呢? 研究发现在海灰翅夜蛾 *Spodoptera littoralis* 的老龄幼虫(3~5 龄)中肠液中有较高的蛋白酶活性, 经 SDS-PAGE 检查发现 Cry1C 原毒素在海灰翅夜蛾的老龄幼虫(3~5 龄)中肠液中可被彻底降解而失去毒性, 并推测这可能是由一种对丝氨酸蛋白酶抑制剂 PMSF 敏感的蛋白酶降解引起的(Keller *et al.*, 1996)。与此相似, Inagaki 等(1992)也发现杀虫晶体蛋白在斜纹夜蛾(*S. litura*)中肠液中过度降解的现象。但他们认为这种过度降解是一种假象, 是在 SDS-PAGE 样品处理过程中造成的, 并由此推测斜纹夜蛾等夜蛾科

昆虫对杀虫晶体蛋白的低度敏感可能是由于毒素与受体结合能力下降引起的。

在棉铃虫中肠液中, 我们也发现有类似的过度降解现象, 并通过多种专一性蛋白酶抑制剂研究分析了多种中肠蛋白酶在这一降解过程的作用(Shao *et al.*, 1998)。结果发现所有丝氨酸蛋白酶抑制剂如大豆蛋白酶抑制剂(SBTI)、苯甲磺酰氟(PMSF)以及胰凝乳蛋白酶抑制剂 TPCK 等对 Cry1A 原毒素的过度降解都有抑制作用, 其中 TPCK 等胰凝乳蛋白酶抑制剂的抑制作用最强。说明多种丝氨酸蛋白酶共同参与了这一降解过程, 其中胰凝乳蛋白酶起了主要作用。同时我们确证, 在体外, 蛋白质变性剂 SDS 的确可引起 Cry1A 原毒素在棉铃虫中肠液中彻底降解, 这可能是 SDS 对原毒素蛋白的变性作用引起的。生物测定结果表明, 马铃薯蛋白酶抑制剂等多种丝氨酸蛋白酶抑制剂都能提高 Cry1A 原毒素对棉铃虫的毒力。由此我们推测, 在体内, 由毒素与受体的结合引起的毒素分子空间构象的转换可能会导致毒素分子内部酶切点暴露, 进而被蛋白酶彻底降解。这可能是老龄夜蛾科害虫对杀虫晶体蛋白低度敏感的真正原因(Shao *et al.*, 1998)。

在枞色卷蛾 *Choristoneura fumiferana* 和粘虫也发现类似现象。Pang 和 Gringorten(1998)报道来自库斯塔克亚种 HD-1 菌株和猝倒亚种(subsp. *sotto*)的原毒素经 50% 浓度的中肠液活化形成的 60~65 kD 的毒性肽要远远比 1% 中肠液活化得到的少, 对家蚕的毒力也较低。夜蛾科的粘虫与棉铃虫对伴孢晶体和溶解状态原毒素的降解结果非常相似, 进一步证明中肠液蛋白水解能力过高是原毒素在夜蛾科幼虫中肠液中过度降解的主要原因(邵宗泽和喻子牛, 1999)。

此外, 在某些昆虫, 中肠液的沉淀作用可能也是影响原毒素毒力的因素之一。枞色卷蛾中肠液中活化原毒素的是一种类胰蛋白酶(Milne *et al.*, 1995)。但是, 其中肠液中还有一种类弹性蛋白酶(75 kD)能引起猝倒亚种原毒素的沉淀, 并因此导致原毒素活化受阻、毒性丧失。在舞毒蛾 *Lymantria dispar*、森林天幕毛虫 *Malacosoma disstria* 和白斑天幕毛虫 *Orgyia leucostigma* 也有类似沉淀作用。

6 中肠液与昆虫对 Bt 抗性的产生

昆虫对 Bt 抗性的发现已引起了各国学者的高

度注意 (McGaughey *et al.*, 1985; Tabashnik *et al.*, 1990, 1996; Van Rie, *et al.*, 1990; De Maagd *et al.*, 1996; Rajamohan *et al.*, 1996; MacIntosh *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 1992; Forcada *et al.*, 1996; Oppert *et al.*, 1994; Ohtsu *et al.*, 1998; Garczynski and Adang, 1995; Adang *et al.*, 1998)。McGaughey (1985) 首次报道了昆虫对 Bt 的抗性。随后, Van Rie 等 (1990 证明这种抗性是由毒素蛋白与昆虫中肠上皮细胞膜受体之间的亲和力下降引起的。基因突变实验结果显示, 毒素-受体亲和力的下降则是由受体蛋白分子上毒素结合位点的改变造成的 (De Maagd *et al.*, 1996; Rajamohan *et al.*, 1996)。

昆虫对 Bt 的抗性形成是多因子作用结果, 它除了与毒素-受体蛋白亲和力的降低有关外, 还可能与中肠液性质的改变有关。例如, 烟芽夜蛾抗性的产生并没有伴随着毒素与受体亲和力的改变 (MacIntosh *et al.*, 1991; Gould *et al.*, 1992)。而且, 在 Cry1Ab、Cry1Ac 及 Cry2A 之间有交互抗性 (Gould *et al.*, 1992), 这是难以单纯从毒素-受体结合方面解释的。Forcada 等 (1996) 进一步研究发现抗性品系烟芽夜蛾的中肠蛋白酶活性发生了改变。敏感品系和抗性品系幼虫的中肠液蛋白水解图谱有差别, 也就是说抗性品系幼虫中肠液蛋白酶组成发生了细微的变化。另外, 两种昆虫对原毒素和毒性肽降解结果也不同, 抗性品系幼虫的中肠液对 Cry1Ab 原毒素的降解速度比敏感幼虫慢, 而对毒性肽的降解速度则比敏感品系的幼虫快。总之, 食入同样量的杀虫晶体蛋白, 抗性品系所产生的毒性肽要比敏感品系少, 因此毒性也就低。这一发现有助于解释经 Cry1Ac 诱导出的抗性品系为什么也对其它的杀虫晶体蛋白如 Cry1Ab 和 Cry2A 有抗性。

印度谷螟 *Plodia interpunctella* 抗性品系中肠蛋白酶活性比易感亲本系降低了 3.5 倍, 对杀虫亚种原毒素的活化能力也明显下降。它不能将 Cry1Ac 原毒素 (133 kD) 快速地转化成 62 kD 的毒性肽, 而只能形成大量的分子量中间产物, 从而形成抗性 (Oppert *et al.*, 1994)。

此外, 抗性的形成可能还与昆虫中肠液的其它特性有关。Ohtsu (1998) 发现抗性小菜蛾中肠液中有一种 60 kD 的蛋白质, 其含量是敏感小菜蛾的 3 倍, 而未发现这种蛋白质有蛋白酶活性。而且两者中肠液对 Cry1Ac 的消化产物也没发现什么差异。关于该蛋白质的性质还未有更深入的探索。

目前, 还从昆虫中肠的其它方面进行对 Bt 抗

性的研究, 这包括受体蛋白的基因克隆和结构分析、上皮细胞膜脂质成分的分析等 (Garczynski and Adang, 1995; Adang *et al.*, 1998; 农广和庞义, 1999)。已经发现, 多种杀虫晶体蛋白的膜受体蛋白即为结合于膜上的氨肽酶 N (aminopeptidase N) (Adang *et al.*, 1998), 氨肽酶 N 上毒素结合位点的改变可能与某些昆虫对 Bt 抗性的形成有关。

综上所述, 昆虫中肠液的生理生化特性是影响 Bt 杀虫晶体蛋白杀虫活性的一个重要方面。昆虫肠道酸碱度不仅影响到伴孢晶体的溶解速度, 还影响到各种蛋白酶的活性高低; 而肠道蛋白酶更是影响杀虫晶体蛋白毒力的一个重要因素, 并与昆虫对 Bt 抗性的产生有关。因此, 为进一步发挥 Bt 在害虫生物防治中的作用, 有必要对目标害虫中肠的有关特性作更深入的研究。

参 考 文 献 (References)

- Adang M J, 1998. Investigation of Cry1 toxin receptor structure and function. In: Proceedings of VIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control & IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*, Sapporo, Japan. 320 - 323.
- Angsuthanasombat C, Crickmore N, Ellar D J, 1992. Comparison of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CryIVA and CryIVB cloned toxins reveals synergism *in vivo*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 94: 63 - 68.
- Bai C, Degheele D, Jansens S, Lambert B, 1993 Activity of insecticidal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 211 - 215.
- Carroll J, D. Convents, J. Van Damme, A. Boets, J. Van Rie, D. J. Ellar, 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A (-endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.*, 70 (1): 41 - 49.
- Choma C T, Kaplan H, 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: evidence that the toxic moiety is present in an active confirmation. *Biochem.*, 29: 10 971 - 10 977.
- Christeller J T, Laing W A, Markwick N P, and Burgess E P J, 1992. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 22 (7): 735 - 746.
- Christeller J T, Shaw B D, 1989. The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. *Insect Biochem.*, 19 (3): 2 133 - 2 141.
- Dai S M, Gill M G, 1993. *In vitro* and *in vivo* proteolysis of the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry IVD protein by *Culex quinquefasciatus* larval midgut proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23: 273 - 283.
- De Maagd R A, Kwa M S G, Van der Klei H, Yamamoto T, Schipper B, Vlak J M, Stiekema WJ, Bosch D, 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin CryIA (b) results in superior tox-

- icity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1 537 – 1 543.
- Forcada C, Encarna A, Garcera M D, and Martinez R, 1996. Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 31: 257 – 272.
- Garczynski S F, Adang M J, 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIA (c) δ -endotoxin binding amonopeptidase in the *Manduca sexta* midgut has a Glycosyl-phosphatidylinositol anchor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (4): 409 – 415.
- Gill S S, Cowles E A, 1992. Pietrantonio P V. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Ann. Rev. Entomol.*, 37: 615 – 636.
- Gould F, Martinez-Ramirez A, Anderson A, Ferre J, Silva F J, Moar W J, 1992. Broad-spectrum resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 7 986 – 7 990.
- Grochuski P, Masson L, Borisova S, Pusztai-Carey M, Schwartz J L, Brousseau R, Cygler M, 1995. *Bacillus thuringiensis* CryIAa insecticidal toxin: crystal structure and channel formation. *J. Mol. Biol.*, 254 (3): 447 – 464.
- Haider M Z, Knowles B H, Ellar D J, 1986. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colneri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic processing of the protoxin by larval gut proteases. *Eur. J. Biochem.*, 156: 531 – 540.
- Hofte H, Whiteley H R, 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.*, 53 (2): 242 – 255.
- Inagaki S, Miyasono M, Ishiguro T, Taketa R, and Hayashi Y, 1992. Proteolytic processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *J. Invertebr. Pathol.*, 60: 64 – 68.
- Johnston K A, Lee M J, Brough C, 1995. Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (3): 375 – 383.
- Johnston K A, Lee M J, Gatehouse J A, and Anstee J H, 1991. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. mol. Biol.*, 21 (4): 389 – 397.
- Keller M, Sneh B, Strizhov N, Prodovsky E, Regev A, Konec C, Schell J, and Zilberstein A, 1996. Digestion of δ -endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 26: 365 – 373.
- Lee M J, Anstee J H, 1995. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (1): 49 – 61.
- Li J D, Carroll J, Ellar D J, 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature*, 353 (31): 815 – 821.
- Li R S, Sheng Z M, 1993. Host specificity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins proteolysed by proteinases of larval gut juice. *Acta Entom. Sin.*, 36: 263 – 269. [李荣森, 盛竹梅, 1993. 昆虫肠道蛋白酶作用下 δ -内毒素的毒性肽及毒力特异性的变化. 昆虫学报, 36: 263 – 269]
- MacIntosh S C, Stone T B, Jakerst R S, Fuchs R L, 1991. Binding of *Bacillus thuringiensis* proteins to a laboratory-selected line of *Heliothis virescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 8 930 – 8 933.
- Martinez-Ramirez A C, Real M D, 1996. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* CryIIIA toxin and specific binding to brush-border membrane vesicles of *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle). *Pestic. Biochem. Physiol.*, 54 (2): 115 – 122.
- McGaughey W H, 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 229: 193 – 195.
- Milne R E, Pang A S D, Kaplan H, 1995. A protein complex from *Choristoneura fumiferana* gut-juice involved in the precipitation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *sotto*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (10): 1 101 – 1 114.
- Milne R, Kaplan H, 1993. Purification and characterization of a trypsin-like digestive enzyme from spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) responsible for the activation of delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 23 (6): 663 – 673.
- Nong G, Pang Y, 1999. The study of receptors of *Bacillus thuringiensis* crystal protein in insect midgut. *Acta Entomol. Sin.*, 42 (3): 327 – 331. [农广, 庞义, 1999. 昆虫中肠 Bt 晶体蛋白受体的研究. 昆虫学报, 42 (3): 327 – 331]
- Novillo C, Castanera P, Ortego F, 1997. Characterization and distribution of chymotrypsin-like and other digestive proteases in Colorado potato beetle larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 36 (3): 181 – 201.
- Ogiwara K, Indrasith L, Asano A, and Hori H, 1992. Processing of δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, 60: 121 – 126.
- Ohtsu K, Hori H, Manuyama T, Hama H, and Mitusui T, 1998. Establishment of *Plutella xylostella* resistant to CryIAc toxin of *Bacillus thuringiensis* and comparative analysis of midgut fluids. In: Proceedings of VIIth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbiol Control & IVth International Conference on *Bacillus thuringiensis*, Sapporo, Japan. 309 – 313.
- Oppert B, Kal J K, Donovan E, MacIntosh S C, McGaughey W H, 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 198 (3): 940 – 947.
- Ortego F, Novillo C, Castanera P, 1996. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 33 (2): 163 – 180.
- Pang A S D, Gringorten J L, 1998. Degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin in host insect gut juice. *FEMS Microbiol. Biol. Lett.*, 167 (2): 281 – 285.
- Qi F, Becktel W, 1994. pH-induced confirmation transitions of CryIA (a), CryIA (c), CryIIIA δ -endotoxins in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem.*, 33: 8 521 – 8 526.
- Rajamohan F, Alcantara E, Lee M K, Dean D H, 1996. Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ -endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J. Biol. Chem.*, 271: 2 390 – 2 396.
- Sakai H, Yamagiwa M, Yoshisue H, 1998. Gene expression and processing

- dynamics of dipteran-specific insecticidal proteins Cry4A and Cry4B. In: Proceedings of VII th International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control & IV th International Conference on *Bacillus thuringiensis*, Sapporo, Japan. 37–42.
- Sha C Y, Bai C, 1994. The effects of pH on the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Entom. Knowledge*, 31 (2): 103–107. [沙槎云, 白成, 1994. pH 对苏云金杆菌晶体致病性的影响. 昆虫知识, 31 (2): 103–107]
- Shao Z Z, Cui Y L, 1995. The mechanism of differential sensitivities of *Bombyx mori* and *Pieris repae* to *Bacillus thuringiensis*. *China J. Biol. Contr.*, 11: 75–79. [邵宗泽, 崔云龙, 1995. 两种鳞翅目昆虫对苏云金芽孢杆菌敏感性差异的机理探讨. 中国生物防治, 11: 75–79]
- Shao Z Z, Cui Y L, Liu X L, Yi H Q, Ji J H, and Yu Z N, 1998. The processing of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *J. Invertebr. Pathol.*, 72: 73–81.
- Shao Z Z, Yu Z Z, 1999. The mechanism of low sensitivity of *Mythmna separata* against δ -endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *China J. Biol. Contr.*, 15: 75–79. [邵宗泽, 喻子牛, 1999. 粘虫对苏云金芽孢杆菌伴孢晶体低度敏感的机理探讨. 中国生物防治, 15 (2): 75–79]
- Siden-Kiamos I, Skavdis G, Rubio J, Papaginnakis G, Louis C, 1996. Isolation and characterization of three serine protease genes in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.*, 5 (1): 61–71.
- Sneh B, Schuster S, Broza M, 1981. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the Egyptian leafworm, *Spodoptera littoralis* Boisd. (Lep. Noctuidae). *Entomophga*, 26: 179–190.
- Tabashnik B E, Cushing N L, Finson N, 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econom. Entomol.*, 83: 1 671–1 676.
- Tabashnik B E, Malvar T, Liu Y B, Finson N, Borthakur D, Shin B S, Park S H, Masson L, de Maagd R A, Bosch D, 1996. Cross-resistance of the diamondback moth indicates altered interactions with domain II of *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 2 839–2 844.
- Van Frankenhuyzen K, Gringorten J L, Milne R E, Masson L, Peferoen M, 1993. Toxicity of activated CryI proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest Lepidoptera and *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.*, 62: 295–301.
- Van Rie J, McGaughey W H, Johnson D E, Barnett B D, Van Mellaert H, 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science*, 247: 72–74.
- Walker A J, Ford L, Majerus M E N, Geoghegan I E, Birch N, Gatehouse J A, Gatehouse A M R, 1998. Characterization of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 28 (3): 173–180.
- Xu G, Qin J, 1994. Extraction and characterization of midgut proteases from *Heliothis armigera* and *Heliothis assulta* (Lepidoptera: Noctuidae) and their inhibition by tannic acid. *J. Econ. Entomol.*, 87 (2): 334–338.